



**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/10, 15/85, 15/74</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 98/53056</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 26. November 1998 (26.11.98)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE98/01421 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 18. Mai 1998 (18.05.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 20 839.8 17. Mai 1997 (17.05.97) DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> SCHINDELHAUER, Dirk [DE/DE]; Clemensstrasse 111, D 80796 München (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> COOKE, Howard, J. [GB/GB]; 8 Stirling Road, Edinburgh EH5 3HY (GB).  <b>(74) Anwalt:</b> HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	

**(54) Title:** METHOD FOR PRODUCING LONG DNA CONSTRUCTS

**(54) Bezeichnung:** HERSTELLUNGSVERFAHREN FÜR LANGE DNA KONSTRUKTE

**(57) Abstract**

The invention relates to a method for producing a DNA construct, whereby two or several DNAs are recombined in melted agarose. The invention also relates to vectors which can be used therefor, in addition to a method for providing large DNAs, specially BACs or PACs.

**(57) Zusammenfassung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines DNA Konstruktes, umfassend die Kombination zweier oder mehrerer DNAs mittels Rekombination in geschmolzener Agarose. Ferner betrifft die Erfindung hierfür verwendbare Vektoren sowie ein Verfahren zur Bereitstellung großer DNAs, insbesondere BACs oder PACs.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Verinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien				

CZ	Tschechien	EE	Estland	UZ	Usbekistan
DE	Deutschland	EL	Griechenland	KG	Kirgisien
DK	Dänemark	FI	Finnland	SD	Sudan
EE	Estland	FR	Frankreich	SI	Slowenien
				SK	Slowakei

### Herstellungsverfahren für lange DNA-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von langen DNA-Konstrukten, insbesondere künstlichen Chromosomen, und hierfür verwendbare Vektoren sowie ein Verfahren zur Bereitstellung großer DNAs, insbesondere BACs oder PACs.

In der modernen Forschung wird angedacht, therapeutische Proteine in tierischer Zellen bzw. transgenen Tieren herzustellen. Ferner wird angedacht, genetische Defekte von tierischen, insbesondere menschlichen Zellen zu reparieren. Insbesondere gibt es Überlegungen, defekte Gene durch entsprechende gesunde zu kompensieren. Hierzu wird z.B. vorgeschlagen, die gesunden Gene in exprimierbarer Form in das Genom der Zellen zu integrieren. Auch wird in Betracht gezogen, die gesunden Gene auf künstlichen Säugetier(Mensch)-Chromosomen "mammalian (human) artificial chromosomes" (nachstehend mit MACs (HACs) bezeichnet) aufzubringen und diese in die Zellen einzuführen. MACs sind lineare DNAs mit einer Größe von mehreren 100 kb. Sie zeichnen sich durch verschiedene Komponenten aus. Diese sind pro MAC ein Zentromer, zwei endständige Telomere und ein dazwischen liegender, zumindest einen "origin of replication" aufweisenden Chromosomenarm. Auf letzterer Komponente können vorstehende Gene aufgebracht werden.

Die Herstellung von MACs ist allerdings mit großen Problemen verbunden. Bisherige Versuche eine solche Herstellung zu erreichen waren nicht befriedigend. Insbesondere stellt die Größe der einzelnen Komponenten ein Klonierungsproblem dar.

- 2 -

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit ein Verfahren und Vektoren, mit denen lange DNA Konstrukte, insbesondere MACs, hergestellt werden können. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren, mit dem große DNAs, z.B. BACs "bacterial artificial chromosomes" oder PACs "phage P1 artificial chromosomes", insbesondere Komponenten von MACs, in großer Menge und Stabilität bereitgestellt werden können.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß große DNAs, wie BACs oder PACs, in geschmolzener Agarose miteinander rekombiniert werden können. Er hat gefunden, daß hiermit MACs hergestellt werden können, wenn die großen DNAs die einzelnen Komponenten von MACs, wie ein Zentromer, z.B. eine alpha Satelliten-DNA, zwei Telomere, z.B. der Sequenz  $(TTAGGG)_{n=135}$ , und einen, zumindest einen "origin of replication" enthaltenden Chromosomenarm, aufweisen. Ferner hat er erkannt, daß Bakterien, die große DNAs, wie BACs oder PACs, enthalten, mit Agarose gemischt werden können, wodurch nach Erkalten der Agarose Agarose-Blöckchen erhalten werden. In diesen kann die chromosomale DNA der Bakterien gespalten werden, während die großen DNAs ungespalten verbleiben. Hierzu wird ein Restriktionsenzym in die Blöckchen eingebracht, das ausschließlich das bakterielle Chromosom spaltet. Dieses kann dann durch Gelelektrophorese aus den Blöckchen entfernt werden, wodurch nur noch die großen DNAs in den Blöckchen verbleiben. Der Anmelder hat erkannt, daß die großen DNAs wie auch die DNA-Konstrukte in den Agarosegel-Blöckchen stabil sind und über lange Zeit aufbewahrt werden können.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders für ein Verfahren zur

- 3 -

Der Ausdruck "DNA-Konstrukt" weist auf eine DNA jeglicher Art und Länge hin, die zirkulär oder linear sein kann. Beispielsweise ist die DNA linear und weist eine Länge von mehreren 100 kb auf. Vorzugsweise ist die DNA ein künstliches Säugetier-Chromosom (MAC). Besonders bevorzugt ist es, wenn das MAC ein  
5 oder mehrere Gene umfaßt, deren Expression gewünscht wird. Beispiele solcher Gene sind jene, die in defekter Form in Verbindung mit Krankheiten, z.B. Mukoviszidose, stehen.

Der Ausdruck "Kombination mittels Rekombination" weist darauf hin, daß zwei  
10 DNAs miteinander rekombinieren können. Dies kann durch überlappende Sequenzen erfolgen. Günstig kann es sein, wenn die Sequenzen rekombinations-spezifische Sequenzen, wie lox- oder FRT-Sequenzen umfassen, wobei die Rekombination dann in Gegenwart einer Rekombinase, wie Cre- oder Flp-Rekombinase, erfolgt. Vorzugsweise führt die Rekombination der zwei DNAs zu  
15 einem MAC. Die DNAs weisen in diesem Fall sämtliche Elemente auf, die für ein MAC wichtig sind. Ferner können Sie ein oder mehrere Gene aufweisen, deren Expression gewünscht wird. Hierzu wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Wird z.B. ein MAC aus zwei DNAs kombiniert, kann es günstig sein, wenn eine der DNAs in linearer und die andere in zirkulärer Form vorliegt.  
20 Letztere kann ein oder mehrere Gene enthalten, deren Expression gewünscht wird. Die lineare DNA kann ein Zentromer und endständige Telomere enthalten, wobei diese entgegengesetzt orientiert sind. Auch können die beiden DNAs in linearer Form vorliegen, wobei jede DNA ein Telomer aufweist, das bei der einen DNA am linken Ende und bei der anderen DNA am rechten Ende in jeweils ande-  
25 rer Orientierung vorliegt. Des weiteren können die beiden DNAs in zirkulärer Form vorliegen, wobei zur Ausbildung eines MAC das zirkuläre Rekombinationsprodukt mittels einer Rekombinationsspaltung linearisiert werden muß.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Vektoren, die ein oder

- 4 -

(TTAGGG)<sub>n-135</sub>, und eine zwischen den Telomer-Anfängen gelegene rekombinationsspezifische Sequenz, z.B. lox-Sequenz, aufweisen. Besonders bevorzugt sind Vektoren, die ferner zwei Resistenzgene aufweisen, wobei eines, z.B. Kanamycin, zwischen den Telomer-Enden und das andere, z.B. Ampicillin, zwischen den Telomer-Anfängen liegt. Auch sind Vektoren bevorzugt, die ferner zwischen den Telomer-Anfängen und/oder -Enden Erkennungssequenzen für seltene und/oder ein bzw. mehrfach schneidende Restriktionsenzyme aufweisen. Besonders bevorzugte Vektoren sind der ditelomerische Vektor PTAT und die monotelomerischen Vektoren PT1, PT1L, PT1LA und PT1LAS. Hierzu wird auf die Beispiele verwiesen. Die erfindungsgemäßen Vektoren können als solche oder in einem Kit vorliegen. Dieser kann ferner eine Rekombinase, wie Cre- oder FLP-Rekombinase, und übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel, etc., enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bereitstellung von großer DNA, insbesondere von BACs oder PACs. Ein solches Verfahren umfaßt folgende Verfahrensschritte:

- (a) Mischen einer Bakterienkultur mit geschmolzener Agarose, wodurch nach Erkalten letzterer Agarose-Blöckchen erhalten werden.
- (b) Einführen einer oder mehrerer Restriktionsenzyme in die Agarose-Blöckchen, wobei die Restriktionsenzyme nur das bakterielle Chromosom, nicht aber die große DNA spalten, und
- (c) Durchführen einer Gelelektrophorese, wodurch das gespaltene bakterielle Chromosom aus den Agarose-Blöckchen entfernt wird, während die große DNA zurückgehalten wird.

- 5 -

Der Ausdruck "Gelelektrophorese" weist darauf hin, daß die Agarose-Blöckchen einer üblichen Gelelektrophorese, insbesondere einer Pulsfeld-Gelelektrophorese, unterzogen werden. Hierzu wird auf die Beispiele verwiesen.

- 5 Der Ausdruck "große DNA" umfaßt große extra chromosomale DNA, z.B. BACs oder PACs.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, lange DNA-Konstrukte, insbesondere künstliche Chromosomen, herzustellen. Diese können gewünschte  
10 Gene enthalten. Ferner können sie lange Zeit in stabiler Weise gelagert werden. Des weiteren können sie beliebig variiert und neuen Erfordernissen schnell angepaßt werden. Es wird auf die Beispiele explizit verwiesen. Die vorliegende Erfindung stellt somit einen Durchbruch in der gezielten Therapie von defekten Genen dar.

15

#### Beschreibung der Zeichnungen:

- Fig. 1: Bereitstellung von konzentrierter, intakter PAC-DNA in Agarosegel-  
20 Blöckchen. Pulsfeld-Gelelektrophorese in 1% Agarose und anschließender Ethidiumbromid-Färbung zur Überprüfung der Spaltung der E. coli-Chromosomen mit der selten schneidenden Restriktionsnuklease *AscI*. Die ungespaltene, zirkuläre, intakte PAC-DNA, die während der Pulsfeldgelelektrophorese (16h, 200V, 5-20s Umschaltzeit, 12°C, 0,5xTAE-Puffer) nicht wandert, verbleibt in den Blöckchen (5 Blöckchen des alpha-Satelliten-PACs von Chromosom X mit einer Länge von 125 Kb), die vor der Färbung aus der Gel-  
25 tasche (Pfeil) entnommen und in TE gelagert werden. Auf diese Weise bleibt während der Abtrennung der E. coli-DNA die hohe

- 6 -

PACs durch IPTG) etwa 2,5 bis 10 PAC-Moleküle pro Zelle tragen. Das E. coli-Chromosom ist etwa 24fach größer als ein PAC-Klon von 200 Kilobasen. Werden die PACs als "unit copy" Plasmide (gleiche Kopiezahl wie das E. coli Chromosom) ohne Induktion des lytischen Replikons mit IPTG verwendet, so kann bis zu etwa 1/24 der zu sehenden Menge (zu sehen ist das fragmentierte E. coli-Chromosom) als intakte PAC-DNA in dem Blöckchen erwartet werden. Das sind sehr große Mengen intakter DNA, die eine weitere in vitro Manipulation dieser langen Moleküle ermöglichen.

Fig. 2: Pulsfeld-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt. Die mit BssHII linearisierten alpha-Satelliten-PACs vom Chromosom X (Bahnen 1-3, 125 kb) und Chromosom 17 (Bahnen 4-6, 140 kb) wurden mit einem MluI-Fragment kombiniert, das den menschlichen HPRT-Genlocus enthält (Bahnen 1-6, 95 kb). Die langen Rekombinationsprodukte mit den voraussagbaren Längen von 216 und 231 kb sind nicht in den Kontrollen ohne Cre-Rekombinase zu sehen (Bahnen 1 und 4) und sind klar sichtbar in Gegenwart der Cre-Rekombinase (Bahnen 2 und 5, in Gegenwart von 1% LMP Agarose). Reaktionen, in denen das Reaktionsgemisch stärker mit der wässrigen Lösung (CreSS Puffer) verdünnt wurde, enthielten eine LMP-Agarose-Konzentration von etwa 0,6% sowie eine entsprechend verringerte DNA-Konzentration (Bahnen 3 und 6). Die geringere Effizienz in den verdünnten Rekombinationsreaktionen weist darauf hin, daß eine passende Agarose-Konzentration und hohe DNA-Konzentrationen entscheidend sind. Bahn 7, 24 kb Leiter aus einer halben 1mm starken Scheibe des MidRange PFG Marker II (New England Biolabs).



- 7 -

vorhanden ist (breites Rechteck), rekombiniert in einer Agarosegel-Matrix in Gegenwart von Cre-Rekombinase. Alpha-Satelliten-DNA-PACs von den menschlichen Chromosomen X (125 kb) und 17 (140 kb), die mit BssHII (Bs) linearisiert wurden, werden mit einem 95 kb MluI (MI)-Fragment, das von einem 175 kb PAC stammt, der den intakten menschlichen HPRT-Genlokus enthält, verbunden. Der Pfeil deutet die Richtung des primären Transkripts (schmales Rechteck) von 42 kb an. MluI Fragmente, die keine lox-Stelle enthalten, sind nicht als Produkte gezeigt. Das kleine Rekombinationsprodukt, das aus 4 kb überlappender PAC-Vektor-Sequenz entstand, hat das Pulsfeld-Gel (in Fig. 2) verlassen.

Fig. 4: Test zur Eignung der mutierten lox-Stelle aus PCYPAC2N für den Einsatz in eine effiziente in vitro Rekombination. Agarosegelelektrophorese und anschließender Southernblot. Hybridisiert wurde mit einem 110 Bp PCR-Fragment als Probe, das mit den Primern LPF und LPR aus PAC-DNA amplifiziert wurde. Die PAC-DNA wurde mit den Restriktionsnukleasen EcoRI (Bahn 1) und HindIII (Bahn 2) gespalten, phenolisiert und äquimolar vermischt. Die Fragmentgemische wurden nach Standardmethoden (NENZYMES, DuPont) in Abwesenheit (Bahn 3) und in Anwesenheit (Bahn 4) von Cre-Rekombinase (0,9 mg/ml) inkubiert. Es sind deutlich erkennbar Rekombinationsprodukte mit der voraussagbaren Länge von 1 kb und 4,9 kb entstanden. Aus dem geschätzten Verhältnis der Substratbanden zu den Produktbanden, geht hervor, daß die in vitro Effizienz dieser mutierten lox-Sequenz des PAC-Vektors (Sequenz Positionen 2016-2049 der Genbank Acc. Nr. U09128) mit der in vitro Effizienz der original loxP-Sequenz vergleichbar ist.

- 8 -

PCYPAC2N- $\Delta$ pUC wurde während der Isolierung von alpha-Satelliten-Klonen aus der PAC Bank (Pieter J. deJong, Ioannou, P.A. 1994 *Nat. Genet.* **6**: 84-89) mit der alpha-Satelliten-DNA-Probe X5 (Waye, J.S., et al. 1985 *Nucleic Acids Res.* **13**: 2731-2743) als Vektor ohne Insert isoliert. Die Klonierstelle BamHI und mehrere umgebende Restriktionsstellen (NotI, EcoRI, HindIII) wurden überprüft und Rekombinationen wurden ausgeschlossen. Ferner sind die Klone weiterhin sensitiv gegenüber saccharosehaltigem Medium, was auf ein intaktes sacB Gen und seines jenseits der Klonierstelle (BamHI, Nukleotid Position 1 in Genbank Acc. U09128) gelegenen Promotors schließen läßt. Die lox-Stelle (schwarzes Dreieck) stammt aus einem Vorläufervektor (pAD10SacBII), aus dem der PAC-Vektor entwickelt wurde. Sie hat keine Funktion in PACs und unterscheidet sich von der ursprünglich veröffentlichten loxP-Sequenz (Sequenz Positionen 2016-2049 der Genbank Acc. Nr. U09128). Das lytische Replikon des P1 Phagen ist mit IPTG induzierbar. Dargestellt sind die Restriktions Stellen NarI (Nukleotid Pos. 11991 in U09128), SspI (Pos. 1605 in U09128), BstXI (Pos. 2917 in U09128) und BfrI (Pos. 3309 in U09128), die für weitere Klonierungen verwendet wurden. Der "multicopy" Plasmidvektor pSXNeo135Isce wurde zuvor mit einer synthetischen IsceI-Stelle aus komplementären Oligonukleotiden ausgestattet (Oligos G438 und G439). Er enthält 135 repetitive Einheiten der TTAGGG Sequenz in Tandem-Reihenfolge (deLange T., et al. 1990 *Mol. Cell. Biol.* **10**: 518-527), deren Funktion, de novo Telomere zu bilden, in TACF-Experimenten bestätigt wurde. Mit den Primern ASaI und ABs wurde das Ampicillin-Resistenzgen aus dem Vektor SP73 (zwischen Nukleotidposition 939-2202 der Genbank Acc. Nr. X65333) amplifiziert. Durch Wahl dieser Primerpositionen wurde

- 9 -

Telomersequenz kann zusammen mit den am Telomersequenz-Ende liegenden NotI- und IScI-Stellen unter Verwendung von ClaI und XbaI herausgespalten werden, und mit gegebener Orientierung in geeignete Spaltstellen kloniert werden.

5

Fig. 6: Karte des monotelomerischen Vektors PT1. Durch Herausspalten des lytischen Replikons und der Klonierstelle des PAC-Vektors PCYPAC2N- $\Delta$ pUC unter Anwendung der Restriktionsnukleasen NarI und SpeI entsteht ein 10,3 kb Fragment, das nur noch das "unit copy"-P1-Phagen-Replikon, das Kanamycin-Resistenzgen und die lox Stelle des PAC-Vektors enthält. Es hat geeignete Enden für die Klonierung der XbaI/ClaI herausgespaltenen 0,9 kb Telomersequenz. Durch Ligierung gehen an beiden Enden sämtliche Restriktionserkennungssequenzen verloren, so daß die erneute Klonierung der gleichen Telomersequenz aus der identischen Gelelektrophorese-Präparation an einer anderen Stelle möglich wird. Dieser Vektor ist geeignet, um lange genomische Fragmente in die singuläre Restriktionsstelle NheI (zwischen Tel 135 und lox, nicht dargestellt, an der Nukleotid Position 1716 in Genbank Acc. U09128) zu klonieren und für die Kombination mit einer zweiten, eine Telomersequenz tragenden Komponente zu verwenden.

10

15

20

25

Fig. 7: Karte des monotelomerischen Vektors PT1L. Durch Spalten des Plasmids PT1 mit BfrI (Nukleotid Position 3309 in Genbank Acc. U09128) und BstXI (Nukleotid Position 2917 in Genbank Acc. U09128) wurde die gerichtete Klonierung des dazu synthetisierten Linkers möglich. Die komplementären Oligonukleotide PT21 und PT22 dienen zur Herstellung des Linkers mit geeigneten Restriktionsstellen für die Klonierung des Amp-Gens und der zweiten,

- 10 -

geeignet, um lange genomische Fragmente in die singuläre Restriktionsstelle NheI (zwischen Tel 135 und lox, nicht dargestellt, an der Nukleotid Position 1716 in Genbank Acc. U09128) zu klonieren und für die Kombination mit einer zweiten, eine Telomersequenz tragenden Komponente zu verwenden.

Fig. 8: Überprüfung der neu integrierten Restriktionsstellen von zwei Klonen aus der PT1L-Klonierung. Klon Nr. 8: Bahnen 1-9, Klon Nr. 12: Bahnen 12-20. Bahnen 1,12: ungespaltene Plasmid DNA. Bahnen 2,13: NotI; Bahnen 3,14: NotI und XbaI; Bahnen 4,15: XbaI; Bahnen 5,16: Sall; Bahnen 6,17: BamHI; Bahnen 7,18: BfrI; Bahnen 8,19: NarI; Bahnen 9,20: BssHII. Bahnen 10,11: 1kb-ladder Längenstandard von Gibco BRL, die oberste Bande entspricht 12 kb. Die Spaltung der NarI-Stelle wurde erst durch Hinzufügen von pBR328 DNA als Aktivator für die Nuklease möglich (vgl. Fig. 11).

Fig. 9: Karte der monotelomerischen Vektoren PT1LA und PT1LAS. Mit den Primern ABs und ASaI wurde ein 1260 Bp Fragment, das das Ampicillin-Resistenzgen enthält (entspricht Positionen 939 - 2202 Genbank Acc. X65333), aus dem Vektor pSXneo135IscI amplifiziert und mit den Restriktionsnukleasen BssHII und Sall, deren Stellen mit modifizierten Primersequenzen geschaffen wurden, gespalten. Das gespaltene, gelulierte PCR-Fragment wurde mit dem BssHII und Sall gespaltenen, gelulierten Plasmid PT1L ligiert und kloniert. Es entstand das geplante Produkt PT1LA und ein weiteres Produkt PT1LAS, das eine zusätzliche Sequenz von 1,8 kb (spacer) integriert hat. Durch die zusätzliche Sequenz (spacer) wurde eine weitere NheI-Stelle eingebracht. PT1LA ist geeignet,

- 11 -

einer zweiten, eine Telomersequenz tragenden Komponente zu verwenden.

5 Fig. 10: Überprüfung der Vektoren PT1LA und PT1LAS durch Restriktionsanalyse. Agarosegelelektrophorese (0,8%) und Ethidiumbromid-Färbung. Bahnen 1-5: PT1LA; Bahnen 6-10: PT1LAS; Bahnen 1,6: ungespaltene Plasmid DNA; Bahnen 2,7: BamHI; Bahnen 3,8: NotI; Bahnen 4,9: NotI und XbaI; Bahnen 5,10: XbaI; Bahn 11: 1 kb ladder, Gibco BRL. Das kleine BamHI-Fragment und das kleine NotI/XbaI-Fragment sowie die Gesamtlänge ist in PT1LAS um 1,8 Kb länger als in PT1LA. Die Differenz zwischen den kleinen BamHI-Fragmenten und den kleinen NotI/XbaI-Fragmenten beider Vektoren entspricht der vollen Länge des 0,9 Kb Telomerfragments.

15 Fig. 11: Aktivierung der NarI-Spaltung in Gegenwart großer Mengen an pBR328. Die mit dem synthetischen Linker eingebrachte NarI-Stelle läßt sich nicht mit NarI spalten, solange keine unterstützende NarI-Stelle in cis oder trans angeboten wird. Bahnen 1-3: PT1LAS; 1: mit NarI alleine gespalten (ungespalten); 2: mit NarI gespalten nachdem zehnfacher Überschuß an pBR328 Plasmid hinzugemischt wurde; 3: mit NarI+pBR328 und Sall gespalten; Bahnen 4-6: PT1LA; 4: mit NarI alleine gespalten (ungespalten); 5: mit NarI gespalten nachdem zehnfacher Überschuß an pBR328 Plasmid hinzugemischt wurde; 6: mit NarI+pBR328 und Sall gespalten; Bahn 20 7: Längenstandard 1 Kb ladder (Gibco BRL). Somit wurde die Lokalisation und die Verfügbarkeit der eingebrachten NarI-Stelle überprüft.

25 Fig. 12: Überprüfung der T4-DNA-Ligierung des zweiten Telomerfragments

- 12 -

Das 13,9 kb NarI/XbaI-Fragment hat Monomere (Pfeil) und Oligomere des 0,9 kb ClaI/XbaI-Telomerfragments aufgenommen. Bahn 1: 1 kb ladder, Gibco BRL, die oberste Bande entspricht einer Länge von 12 kb.

5

Fig. 13: Karte des ditelomerischen Vektors PTAT. Zur Einführung der zweiten Telomersequenz, die aus der identischen Aufbereitung des bereits für die Klonierung der ersten Telomersequenz verwendeten Materials stammt, und somit XbaI und ClaI Enden für die gerichtete Integration enthielt, wurde der Vektor PT1LAS mit den Restriktionsnukleasen NarI und XbaI an den neu integrierten Erkennungsstellen gespalten. Die Spaltung der NarI-Stelle des eingeführten Linkers mußte durch Zugabe einer zehnfachen Menge von pBR328-DNA aktiviert werden. Durch Ligierung gehen die NarI- und ClaI-Stellen verloren, während die XbaI-Stelle erhalten bleibt. Die auf dem 0,9 Kb Fragment unmittelbar an den Telomersequenz-Enden liegenden Restriktionsspaltstellen NotI (8 Bp, selten vorkommende Erkennungssequenz) und IScel (17 Bp Konsensussequenz, die praktisch nicht vorkommt, schneidet wahrscheinlich kein einziges mal im menschlichen Genom) liegen in beiden Fällen in geplanter Orientierung.

10

15

20

Fig. 14: Restriktionskarte des ditelomerischen Vektor Prototyps PTAT. Die dargestellten Restriktionsschnittstellen dienen zur Überprüfung der Klonierungen. Die beiden NotI-Stellen (8Bp rare cutter), sowie die IScel-Stelle (die 17 Bp Erkennungssequenz ist extrem selten anzutreffen, das menschliche Genom enthält wahrscheinlich keine einzige IScel Stelle) wurden zusammen mit den Telomersequenzen (TTAGGG) n = 135 auf einem 0,9 Kilobasen langen Fragment inte-

25

sert. Die Bahn 1 stellt die 1 kb Ladder dar, die anderen Bahnen zeigen die

- 13 -

und der XbaI-Stelle am Anfang der unteren Telomersequenz, die ebenfalls von dem verwendeten 0,9 kb Telomer-Fragment stammen, sowie die erhaltenen Längen von 0,9 kb dienen als Beweis, daß die Telomersequenzen vollständig, ohne Deletion integriert wurden. Die Abstandshalter-Sequenz von 1,8 kb (spacer) ist in einem Klon während der Klonierung des Ampicillin-Resistenzgens spontan aufgetreten. Die Schnittstellen der Restriktionsnukleasen Accl, BfrI, NheI sind in der Anordnung, wie sie im Spacer auftreten, nicht in einem der verwendeten Ausgangsklone (PCYPAC2N- $\Delta$ pUC, pSXNeo135IscI) anzutreffen. Die Herkunft der Spacer-DNA ist nicht bekannt, sie könnte aus dem verwendeten E. coli-Stamm herühren. Mit dem Vektor PT1LA, der nur das Ampicillin-Resistenzgen und keinen Spacer enthält, ist die Klonierung der zweiten Telomersequenz nicht geglückt. Die restriktionskartierte Spacer-Sequenz könnte stabilisierend auf ein ditelomerisches Plasmid wirken. Zur weiteren Überprüfung der Struktur wurden PCRs durchgeführt. Folgende Primerpaare ergaben die erwarteten Produkte: Kr und Kf; Kr und G439; G438 und LPF; LPF und LPR; LPR und ABs; ASaI und ABs; die lange PCR ASaI und G438 ergab kein Produkt (1 min 95°C, 1 min 62°C, 4 min 72°C, 25 Zyklen, Taq Polymerase mit Hersteller-Puffer von Amersham).

Fig. 15: Überprüfung der Integrität des ditelomerischen Vektors PTAT mittels Restriktionsanalyse: Agarosegelelektrophorese 0,8% und Ethidiumbromid-Färbung. Bahnen 1,19: 1 kb ladder (Gibco BRL); Bahn 2: ungespaltene Plasmid DNA; Bahnen 3-18: gespaltene Plasmid-DNA mit den Enzymen: 3: BfrI; 4: BfrI und NheI; 5: NheI; 6:XbaI; 7: XbaI und Sall; 8: Sall; 9: Sall und BssHII; 10: BssHII; 11: Accl; 12: BamHI; 13: BamHI und Sall; 14: NotI und Sall; 15:

- 14 -

ten Fragmente mit telomerischen Sequenzen, hybridisieren mit dem 0,9 Kb Telomerfragment als Probe. Die Spacer-DNA zeigt unspezifische Signale mit der Telomerfragment-Probe (Ergebnis nicht dargestellt). Alle Spaltungen entsprechen der geplanten Struktur des Vektors PTAT. In Bahn 20 wurde die Herausspaltbarkeit des ditelomerischen Fragments von 6,1 Kilobasen (Pfeil) mit der unmittelbar an den Enden der Telomersequenzen liegenden Nuklease Iscel, die mit ihrer 17 Bp Erkennungssequenz äußerst selten vorkommt, nachgewiesen.

Fig. 16: Die Nukleotid-Sequenzen der synthetischen Primer, die zur Klonierung und Überprüfung der Klonierung von PTAT und seinen Vorläufern dienten.

Fig. 17: Durch Spaltung des Vektors PTAT mit der extrem selten schneidenden Restriktionsnuklease Iscel oder der selten schneidenden Restriktionsnuklease NotI wird ein 6,1 Kilobasen langes ditelomerisches Fragment mit jeweils nach außen weisenden, terminalen Telomersequenzen (TTAGGG) $_n$  = 135 erhalten. Aus TACF-Experimenten ist bekannt, daß auch de novo Telomere gebildet werden, wenn sich außerhalb des Telomersequenz-Endes weitere DNA-Abschnitte befinden. Demnach kommen auch andere Schnittstellen, die zum Beispiel in PTAT nur einmal zwischen den Telomersequenz-Enden schneiden, als Nukleasen zur Freigabe der Telomersequenzen in Betracht. Es bestehen verschiedene Möglichkeiten, zusätzliche DNA Abschnitte zwischen die Telomere zu klonieren. Eine kleine Auswahl an geeigneten Schnittstellen, die nur einmal im Vektor PTAT schneiden, ist dargestellt (Sall, BssHII, XbaI). Darüber hinaus



- 15 -

Fig. 18: Die Klonierung einer chromosomalen Komponente, die aus einem Chromosomenarm mit einem Gen (G) besteht, in den ditelomeren Vektor PTAT oder seine Abkömmlinge, ermöglicht die freie Wahl der Zentromer-Komponente (Z) und ihre Insertion in einem einzigen in vitro Schritt. Das Rekombinationsprodukt besteht aus zusammengefügt, identischen Material, das nicht erneut analysiert werden muß.

Fig. 19: Die Klonierung einer Zentromer-Komponente (Z) in den mit einem oder mehreren Markern (M) ausgestatteten, ditelomeren Vektor führt zum MAC-Basis-Konstrukt TZT. Es ermöglicht die Kombination einer beliebigen, zirkulären Komponente (G). Somit können verschiedene therapeutische Gene mittels IGSSR in einem einzigen in vitro Schritt in das Basis-MAC-Konstrukt inseriert werden. Aus der Kenntnis der Struktur der beiden Substrate ergibt sich die exakte Struktur des produzierten MAC-Konstrukts, ohne weitere Analysen zu benötigen.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert:

**Beispiel 1: Kombination von PACs mittels lox-Cre-Rekombinase in geschmolzener Agarose.**

Es wird eine Rekombination durchgeführt, in der ein 120 kb langer alpha-Satelliten-DNA-PAC-Klon von Chromosom X und ein 140 kb langer alpha-Satelliten-DNA-PAC-Klon von Chromosom 17 zusammen mit einem 95 kb langen HPRT(Hypoxanthin-Phosphoribosyl transferase)-Genfragment verwendet werden.

- 16 -

Die PAC Klone werden in einem End-Kulturvolumen von 100 ml LB Medium propagiert (Kanamycin Selektion, IPTG Induktion). Es werden Bakterien-Blöckchen in Agarose hergestellt (Smith, C.L. et al. 1988 In Davies, K.E. *Genome Analysis*, IRL Press, Oxford, 41-49). Um besonders hohe DNA-Konzentrationen zu erzielen, wird 1 Volumen Bakterien-Niederschlag mit 2 Volumen einer 2%igen LMP-Agarose (low melting point agarose, Gibco BRL) vermengt. Alle Puffer und Lösungen werden aus destilliertem Wasser angefertigt, das 0,1 mM EGTA enthält. Um das E. coli-Chromosom zu fragmentieren, während das PAC intakt bleibt, wird die im Blöckchen befindliche DNA mit einer Restriktionsnuklease behandelt, die nicht im PAC aber im E. coli-Chromosom schneidet (in diesem Fall Ascl). Die Restriktionsspaltung wird im Hersteller-Puffer durchgeführt, dem 0,75 mM Spermidin/3HCl und 0,3 mM Spermin/4HCl zugefügt wird. Anschließend erfolgt Proteinase-K-Behandlung der Blöckchen. Die Blöckchen werden auf ein 1%iges Agarosegel für Pulsfeld-Gelelektrophorese geladen, das nicht mit geschmolzener Agarose versiegelt wird. Nach einer 16-stündigen Laufzeit bei 200 V mit einer ansteigenden Schaltzeit von 5-20 s in 0,5 x TAE Puffer bei 12°C werden die Blöckchen, die zirkuläre PAC DNA enthalten, wieder aus den Geltaschen befreit und in TE bei 4°C gelagert. Zur Beurteilung der vollständigen Spaltung der E. coli-Chromosomen wird das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Die E. coli-Fragmente zeigen ein Muster, das sich in deutlichem Abstand von den Geltaschen befindet (Fig. 1). Die Blöckchen enthalten große Plasmide mit einer Konzentration, die bis zu 1/3 der Kon-

- 17 -

**(B) Kombination der PAC-Klone mittels lox-Cre-Rekombinase in geschmolzener Agarose.**

Die zu verbindenden PACs werden restriktionskartiert und mit ausgewählten Restriktionsnukleasen gespalten, um Fragmente zu erzeugen, die in der lox Stelle überlappen und in entgegengesetzte Richtungen weisen. Von vielen möglichen Nukleasen wurde BssHII für die alpha-Satelliten-PACs und MluI für den HPRT-Gen-PAC verwendet (Fig. 3). Vollständige Spaltung wird mit 1/10 eines Blöckchens (etwa 15  $\mu$ l), das aus der Mitte des Blöckchens herausgeschnitten wurde, mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung kontrolliert. Die 9/10 beider Blöckchen mit der zu verbindenden DNA werden 4 x 30 min in CreSS Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM NaCl, 0,75 mM Spermidin/3HCl, 0,3 mM Spermin/4HCl) inkubiert und anschließend mit 130  $\mu$ l CreSS Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereint. Dadurch entsteht ein Volumen von ca. 400  $\mu$ l und eine LMP-Agarose-Konzentration von ca. 1%. Das Gemisch wird für 10 min bei 67°C unter vorsichtigem Rühren mit einer Pipettenspitze inkubiert. Anschließend wird für 5 min bei 42°C inkubiert. Danach wird BSA (Bovines Serum Albumin, 4  $\mu$ l einer 10mg/ml Lösung) und DTT (0,4  $\mu$ l einer 1M Lösung) unter vorsichtigem Rühren dazugegeben. Für die nächsten 30 min wird weiterhin bei 42°C inkubiert und mehrmals vorsichtig gerührt. Um eine Kontrolle des Materials ohne Rekombination zu erhalten, werden 80  $\mu$ l mit einer Pipettenspitze mit weiter Bohrung (ca 3mm) vorsichtig in eine Blöckchenform übertragen. Während der nächsten 30

- 18 -

insgesamt 6  $\mu$ l Cre hinzugefügt wurden, schrittweise auf 37°C gesenkt. Das Reaktionsgemisch wird für zwei min erneut auf 39°C erwärmt und unter Verwendung von vorgewärmten Pipettenspitzen (45°C) mit weiter Bohrung (3mm) vorsichtig in vorgewärmte Blöckchenformen (40°C) gebracht, die sich in einer isolierten Kammer befinden. Dabei muß darauf geachtet werden, daß das Reaktionsgemisch nicht unter 30°C abkühlt, was zum Erstarren der Agarose führen würde. Das weiterhin geschmolzene Reaktionsgemisch wird anschließend für 30 min bei 37°C und für 30 min bei 32°C inkubiert. Durch Abkühlen auf Raumtemperatur erstarren die Blöckchen. Die Blöckchen werden mit Proteinase-K behandelt und können im Proteinase-K Puffer (enthält SDS und EDTA, für langfristige Lagerung für mehrere Monate) oder in TE gelagert werden. 1/4 eines resultierenden Blöckchens wird mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung analysiert (Fig. 2).

Es wird darauf hingewiesen, daß auch eine andere sequenzspezifische Rekombination, z.B. über die FLP-Rekombinase mit der Erkennungssequenz FRT, durchgeführt werden kann.

## Beispiel 2: Herstellung erfindungsgemäßer Vektoren.

### (A) Herstellung des monotelomerischen Vektors PT1.

Aus dem PAC-Vektor PCYPAC2N (Fig. 5) wurde ein "unit

- 19 -

Klonierstelle entfernt. Auf diese Weise bleibt das P1-Phagen-Replikon, das Kanamycin-Resistenzgen und die lox-Stelle auf einem Fragment erhalten. Die lox Stelle stammt aus Vorläuferklonen des Vektors PCYPAC2N und ist als Klonier-Überbleibsel ohne Funktion für PACs noch vorhanden. In einer in vivo Reaktion wurden zwei lox-Stellen für die Herstellung des PAC-Vektors zusammengefügt. Um die Eignung der in PACs vorhandenen lox-Stelle als funktioneller Rekombinationsort für eine effiziente Rekombination in geschmolzener Agarose zu prüfen, wurden in vitro Rekombinationstests durchgeführt. Dies wurde insbesondere wichtig, da die Sequenz der lox Stelle im PAC Vektor sich von der ursprünglich veröffentlichten lox-Sequenz unterscheidet (Sequenz Positionen 2016-2049 der Genbank Acc. Nr. U09128) und eine effiziente in vitro Rekombination dieser Sequenz nicht bekannt war (Fig. 4). Für die Klonierung der ersten Telomersequenz wurde die PAC-Vektor-DNA mit den Restriktionsnukleasen NarI und SpeI gespalten (Boehringer Enzyme und Puffer). Anschließend wurde die DNA durch Ethanolpräzipitation gereinigt, in Puffer für alkalische Phosphatase aufgenommen und für 30 min dephosphoryliert (Boehringer). Nach einmaliger Phenolisierung wurde das 10,3 Kb Fragment nach 12h Gellauf bei 30V in 0,5xTAE aus einem 1% Agarosegel (LMP-Agarose, Gibco BRL) unter Vermeidung von UV-Bestrahlung eluiert, mit GeneClean-Kit gereinigt und in TE aufgenommen. Etwa 10 ng DNA wurden mit dem geleluierten ClaI/XbaI Telomer-Fragment von 0,9 Kb, das in mehrfachem Überschuß verwendet wurde, über Nacht bei 4-20°C mit T4-DNA-Ligase in entsprechendem

- 20 -

wurden für 2h gegen destilliertes Wasser dialysiert (Tropfen-Dialysier-Membran, Gibco BRL) und zur Transformation von 40  $\mu$ l elektrokompenten Zellen (ElectroMAX DH10B Cells, Gibco BRL) verwendet. Die Transformation erfolgte in einer 100 $\mu$ l Küvette bei 1,8 KV durch Elektroporation. Kanamycin-resistente Klone (30 $\mu$ g/ml) wurden mittels PCR aus Bakterienkolonien auf Anwesenheit des Telomerfragments getestet. Dafür wurden die Primer LPF und G438 verwendet (62°C, 30 Zyklen, Taq-Polymerase; vgl. Fig. 14 und 16). Das erwartete 1,3 Kb Produkt war nicht zu sehen. Statt dessen hatte jeder der 7 resistenten Klone ein Gemisch aus PCR-Produkten mit Längen von 600 bis 800 Bp. Durch anschließende Restriktionskartierung aus isolierter Plasmid-DNA konnte gezeigt werden, daß alle Klone die volle Länge des ursprünglichen Telomerfragments von 0,9 kb besitzen. Die Reduktion der Länge während einer PCR-Amplifikation, die die Telomersequenz überspannt, wurde bereits in dem Ausgangsklon pSXneo135 (Fig. 5) beobachtet. Sie ist auf die besondere, repetitive Beschaffenheit der Telomersequenz zurückzuführen. Sind die (TTAGGG) Einheiten untereinander streng homolog, wird das PCR-Produkt kaum länger als 400 Bp (plus umliegende Sequenzen), unabhängig davon, wie lang die eigentliche Telomersequenz ist. Dieses besondere PCR-Verhalten der streng homologen Telomersequenzen kann diagnostisch genutzt werden, um die Güte der Telomersequenz zu überprüfen, wenn in einer Restriktionskartierung gleichzeitig die volle Länge nachgewiesen wird. Um aus den Bakterien, die "unit copy" Plasmide tragen und somit bis zu 50 mal weniger Plasmid-Moleküle besitzen als

- 21 -

alkalische Lyse-Isolierung verarbeitet. Eine Karte des Vektors PT1 ist in Fig. 6 dargestellt.

5                   **(B) Herstellung des monotelomerischen Vektors PT1L durch Integration eines synthetischen Linkers in PT1.**

10                   Für die spätere Integration eines zweiten Resistenzgens (Amp) und der zweiten Telomersequenz sowie der Verfügbarkeit von einmal schneidenden Restriktionsstellen zur Klonierung von genomischen Fragmenten (Gen/Zentromer) oder eines selektionierbaren Markergens zwischen die Telomersequenzen, wurde ein Linker zwischen lox-Stelle und P1-Replikon integriert (Fig. 7). Um die gleiche Telomerfragment-Präparation verwenden zu können, die zur Klonierung von PT1 führte, wurde eine NarI-Stelle und eine XbaI-Stelle eingebracht. Für die Integration des Amp-Gens und gleichzeitig für das Vorhandensein von selten schneidenden Restriktionsstellen wurde eine BssHII- und eine Sall-Stelle eingebracht. Zwei synthetische Oligonukleotide PT21 und PT22 ergeben einen doppelsträngigen Linker für diesen Zweck (Sequenzen in Fig. 16). Die überhängenden Enden des Linkers werden in gegebener Orientierung in die singulären BfrI- und BstXI-Stellen ligiert. Hierfür wurden 10 ng der BfrI/BstXI (Boehringer) gespaltenen, nicht dephosphorylierten PT1-DNA geluliert und mit 1 µg unphosphorylierter Linker-DNA verwendet. (Transformation wie oben beschrieben). Zwei der vier durch Restriktionskartierung analysierten Klone enthielten alle neuen Restriktionsstellen. Die einzige

15

20

25

- 22 -

tiver gespaltene NarI-Stellen in cis oder trans zur Verfügung gestellt werden. Wird zehnfacher Überschuß an pBR328 zur Spaltreaktion hinzugemischt, ist die integrierte NarI-Stelle zufriedenstellend spaltbar (Fig. 11).

5

**(C) Herstellung der monotelomerischen Vektoren PT1LA und PT1LAS.**

10

Um zwei unabhängige Resistenzgene zwischen den Telomersequenz-Enden und -Anfängen eines ditelomerischen Vektors zu haben, wurde das Ampicillin-Resistenzgen (Amp) aus dem Vektor SP73 (Fig. 5) in die neu geschaffenen Restriktionsstellen BssHII und Sall des Vektors PT1L kloniert. Dabei mußte insbesondere darauf geachtet werden, daß der nahe am 3' Ende des Ampicillin-Resistenzgens gelegene, "multy-copy"-Replikationsursprung (ori) der pBR-Plasmide nicht auch in das "unit-copy"-Plasmid integriert wird, um die Kopienzahl so klein wie möglich zu halten. Gleichzeitig sollte das Amp-Fragment bis direkt an den ori heranreichen, um Transkriptionsterminations-Signale des Amp-Transkripts zu gewährleisten. An der Grenze zwischen Amp und ori liegen keine geeigneten Restriktionsstellen, die für ein Herausspalten und die anschließende Klonierung verwendet werden konnten. Möglich war die Synthese der Oligonukleotide ASal und ABs, die durch Änderung einzelner Nukleotide mit den Restriktionsstellen Sall (in 5' von Amp) und BssHII (in 3' von Amp) ausgestattet wurden. Das Amp-Gen wurde auf einem 1260 Bp Fragment amplifiziert, das PCR-Produkt wurde mit

15

20

25



- 23

wurden zwei Kolonien erhalten, die doppelt resistent für Ampicillin und Kanamycin waren. Beide Kolonien waren positiv für die PCR mit den Primern G438 und LPF, um das Vorhandensein der ersten Telomersequenz zu kontrollieren, positiv für die PCR mit den Primern ASal und ABs (entspricht der Resistenz gegenüber Ampicillin) sowie positiv für die PCR mit den Primern ABs und LPR (Bestätigung der geplanten Orientierung). Von diesen hatte ein Klon (PT1LA, 12,1 Kb) die vorausgesagte Struktur, in der Restriktionsanalyse und der andere Klon (PT1LAS, 13,9 Kb) hatte eine zusätzliche 1,8 kb Sequenz am 3' Ende des Amp-Gens integriert (Fig. 9 und 10). Dabei ist die Primerbindungsstelle für ABs unmittelbar in 3' des Amp-Gens erhalten geblieben, jedoch die BssHII-Stelle selbst ist durch die integrierte Sequenz um 1,8 Kb versetzt worden. Aus der Ligierungsreaktion wurde der Klon PT1LAS erhalten.

**(D) Herstellung des ditelomerischen Vektors PTAT aus PT1LAS.**

Für die Klonierung des zweiten Telomerfragments wurden die Restriktionsstellen NarI und XbaI in die Linker-DNA von PT1L (und damit PT1LAS) eingebracht. Die Spaltung der Restriktionsstelle NarI wurde durch Zumischen eines zehnfachen Überschußes an pBR328-Plasmid möglich (Fig. 11). Das NarI und XbaI gespaltene 13,9 Kb Fragment des Plasmides PT1LS wurde mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, einmal phenolisiert, aus 1%igem LMP-Agarosegel nach Elektrophorese eluiert und mittels GeneClean-Kit gereinigt. Es wurde wie bei der Klonierung von PT1 ver-

- 24 -

tels alkalischer Lyse einer Restriktionsanalyse unterzogen. Einer der erhaltenen Klone wurde analysiert und zeigte das erwartete 10,5 Kb BamHI-Fragment, das beide Telomersequenzen und das P1-Replikon enthält. Um die gesamte Struktur des ditelomerischen Vektors PTAT zu überprüfen, wurde eine umfangreiche Restriktionsanalyse durchgeführt (Fig. 15). Die vorausgesagte Struktur konnte vollständig bestätigt werden und die Funktion der extrem selten schneidenden IScel-Stellen an beiden Telomersequenz-Enden wurde nachgewiesen. Das bedeutet, daß ein Plasmid zur Verfügung steht, das stabil propagiert werden kann, um lange Fragmente als chromosomale Komponenten zu klonieren und in geschmolzener Agarose mit einer zweiten stabil klonierten chromosomalen Komponente zu verbinden.

**(E) Vektor PTAT als Basis für die verschiedensten Anwendungen.**

Das 6,1 Kb lange NotI- oder IScel-Fragment von PTAT, das an beiden Enden Telomersequenzen besitzt, kann für verschiedene Zwecke modifiziert werden. Dafür können die integrierten Restriktionsstellen XbaI, Sall und BssHII als einmal vorkommende oder andere Stellen verwendet werden. Zusätzlich kann in eine der bestehenden Schnittstellen eine MCS (multiple cloning site) eingeführt werden, die zweckmäßigerweise Erkennungssequenzen von eher selten schneidenden Restriktionsnukleasen enthalten sollte. Weiterhin könnten bestehende mehrfach vorkommende Restriktionsstellen durch Einbringen von Mutationen verändert

- 25 -

coli oder Säugerzellen verwendet werden können oder DNA-Fragmente für Zwecke des Nachweises für MACs in lebenden Zellen (z.B. über spezifische DNA Erkennungssequenzen von Bindungsproteinen die an gelly fish protein gekoppelt sind (GFP)). Eine andere Möglichkeit der Modifizierung wäre die Klonierung eines DNA-Fragments von PTAT oder Abkömmlingen, das beide Telomersequenzen enthält (z.B. das 6,1 Kb NotI-Fragment), in einen anderen bestehenden Vektor (etwa BAC Vektoren, andere PAC Vektoren, oder andere Vektoren) oder in bestehende genomische Klone. Diese Möglichkeit ist insbesondere dadurch erleichtert, da auf Anwesenheit des Fragments nach einer Umklonierung selektioniert werden kann (Ampicillin-Resistenz). Verbesserte PTAT-Versionen könnten dann für die Klonierung oder Umklonierung eines langen genomischen Abschnitts (z.B. genomische Kopie eines Gens oder Zentromer-Kandidatensequenz) verwendet werden.

Wird in PTAT oder seine Abkömmlinge zunächst eine genomische Kopie des menschlichen HPRT-Gens von Beispiel 1 auf einem langen Fragment kloniert (oder andere selektionierbare Säugergene), so kann in geschmolzener Agarose der entstehende Chromosomenarm, der an beiden Enden Telomere enthält, mit beliebigen zirkulären Zentromer Kandidatensequenzen verbunden werden, die eine geeignete Rekombinations-Stelle enthalten (bei PTAT wäre das z.B. jeder PAC-Klon einer genomischen Bank, die mit dem Vektor PCYPAC2N hergestellt worden ist). Aus der Analyse der einzelnen Komponenten wäre bereits die Struktur der MAC

- 26 -

weiterer Vorteil für die Gewinnung des Rekombinationsproduktes entsteht. Werden beide Komponenten als zirkuläre DNA in die Rekombinationsreaktion eingesetzt, so entstehen große zirkuläre Produkte. Diese können durch anschließende Pulsfeld-Gelelektrophorese von dem kaum zu vermeidenden, kleinen Anteil teilweise degradierter DNA vollständig befreit werden. Im Blöckchen bleibt wiederum nur intakte DNA zurück. Nach Spaltung unmittelbar an den Telomersequenz-Enden laufen nur zwei gut auftrennbare Fragmente in das Gel. Das "kleine" ditelomerische Fragment, das nicht rekombiniert hat, und das rekombinierte "lange" ditelomerische MAC-Konstrukt. Der Anteil der zirkulären Komponente, der nicht rekombinierte, verbleibt im Blöckchen. Durch Transfektion verschiedener Konstrukte kann der MAC ermittelt werden, der das effizienteste Zentromer enthält. Ein auf diese Weise identifiziertes "bestes" Zentromer würde in verbesserte PTAT-Versionen kloniert werden, um einen MAC-Basisvektor TZT (Telomer-Zentromer-Telomer) zu erhalten. Dieser kann im geschmolzenen Agarose mit jeder beliebigen zirkulären DNA Komponente kombiniert werden, die eine geeignete Rekombinationsstelle enthält (je nach Design von TZT wäre das eine lox Stelle oder Abkömmlinge in Verbindung mit der Rekombinase Cre, eine FRT Stelle in Verbindung mit der Rekombinase FIp, oder beide gleichzeitig, oder andere sequenzspezifische Rekombinationsstellen für eine effiziente in vitro Anwendung) (Fig. 19).

## Tabelle 1:

## Synthetische Oligonukleotide:

5 G438: 5'-GGCCGCGCTAGGGATAACAGGGTAATATA-3'  
G439: 5'-GGCCTATATTACCCTGTTATCCCTAGCGC-3'

Durch Annealen von G438 mit G439 entsteht ein doppelsträngiges DNA-Fragment, das eine Iscel-Konsensus-Sequenz enthält und in eine NotI-Stelle kloniert werden kann.

10

LPF: 5'-GAAACGGCCTTAACGACGTAGTCG-3'

LPR: 5'-ATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTG-3'

PCR-Primer um 110 Bp des PAC-Vektors zu amplifizieren, die die lox-Stelle enthalten (Nukleotid Positionen 1973-2082 Genbank Acc. U09128).

15

ASal: 5'-GCGAGTCGACAGGGCCTCGTGATACG-3'

ABs: 5'-GATTGCGCGCAGAAAAAAGGATCTC-3'

PCR-Primer um 1263 Bp des Vektors pSP73 (Nukleotid Positionen 939-2202 Genbank Acc. X65333) mit dem Ampicillin-Resistenzgen zu amplifizieren. Die Sequenzen der Primer sind in einzelnen Basen modifiziert, um eine BssHII-Spaltstelle (ABs) und eine Sall-Spaltstelle (ASal) an den Enden des PCR-Produkts einzuführen.

20

Kf: 5' GGAAAACAGCATTCCAGGTATTAG 3'

25 Kr: 5'-CCATGAGTGACGACTGAATCCG-3'

PCR-Primer um 282 Bp des Kanamycin-Resistenzgens des PAC-Vektors zu amplifizieren (Nukleotid Positionen 10683-10965 der Genbank Acc. U09128).

PT21:

- 28 -

PT21 und PT22 annealen zu einem doppelsträngigen DNA Fragment, das als Linker verwendet wurde, um die Restriktionsstellen NarI, XbaI, BamHI, BssHII und Sall zwischen die Restriktionsstellen BfrI (Nukleotid Position 3309 im Vorläufer Acc. U09128) und BstXI (Nukleotid Position 2917 im Vorläufer Acc. U09128) des Vektors PT1 einzuschleusen.

5

**P a t e n t a n s p r ü c h e**

5

1. Verfahren zur Herstellung eines DNA-Konstruktes, umfassend die Kombination zweier DNAs mittels Rekombination in geschmolzener Agarose.

10

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das DNA-Konstrukt eine Länge von mehreren 100 kb aufweist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei das DNA-Konstrukt ein künstliches Säugetier-Chromosom (MAC) ist.

15

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Säugetier ein Mensch ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, wobei die Rekombination über rekombinationsspezifische Sequenzen i.V.m. einer Rekombinase erfolgt.

20

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Rekombination über lox-Sequenzen i.V.m. einer Cre-Rekombinase erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Rekombination über FRT Sequenzen i.V.m. einer FLP-Rekombinase erfolgt.

25

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1- 7, wobei eine der DNAs zirkulär und die andere linear ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1- 7 wobei beide DNAs linear sind

- 30 -

11. Vektor mit ein oder mehreren Telomeren.
12. Vektor nach Anspruch 11, wobei zwei Telomere vorliegen.
- 5 13. Vektor nach Anspruch 11, wobei die zwei Telomere entgegengesetzt orientiert sind und zwischen den Telomer-Anfängen eine rekombinations-spezifische Sequenz vorliegt.
- 10 14. Vektor nach Anspruch 13, wobei die rekombinationsspezifische Sequenz eine lox-Sequenz ist.
- 15 15. Vektor nach einem der Ansprüche 12-14, umfassend ferner zwei Resistenzgene, wobei eines davon zwischen den Telomer-Enden und das andere zwischen den Telomer-Anfängen liegt.
16. Vektor nach einem der Ansprüche 12-15, umfassend ferner zwischen den Telomer-Anfängen und/oder -Enden Erkennungssequenzen für seltene und/oder ein- bzw. mehrfach schneidende Restriktionsenzyme.
- 20 17. Verfahren zur Bereitstellung von großer DNA, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:
- (a) Mischen einer Bakterienkultur mit geschmolzener Agarose, wodurch nach Erkalten letzterer Agarose-Blöckchen erhalten werden.
- 25 (b) Einführen einer oder mehrerer Restriktionsenzyme in die Agarose Blöckchen, wobei die Restriktionsenzyme nur das bakterielle Chromosom, nicht aber die große DNA spalten, und
- (c) Durchführen einer Gelelektrophorese, wodurch das gespaltene



- 31 -

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die große DNA ein BAC oder ein PAC ist.

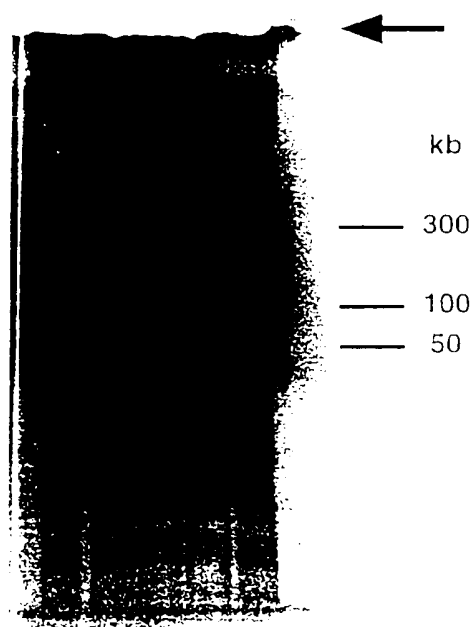


Fig. 1

2/18

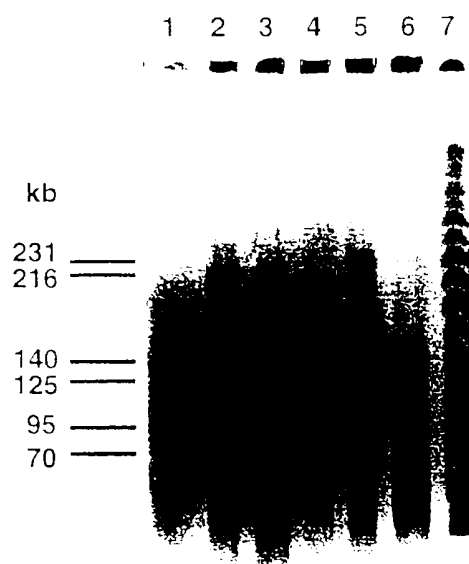


Fig. 2

3/18

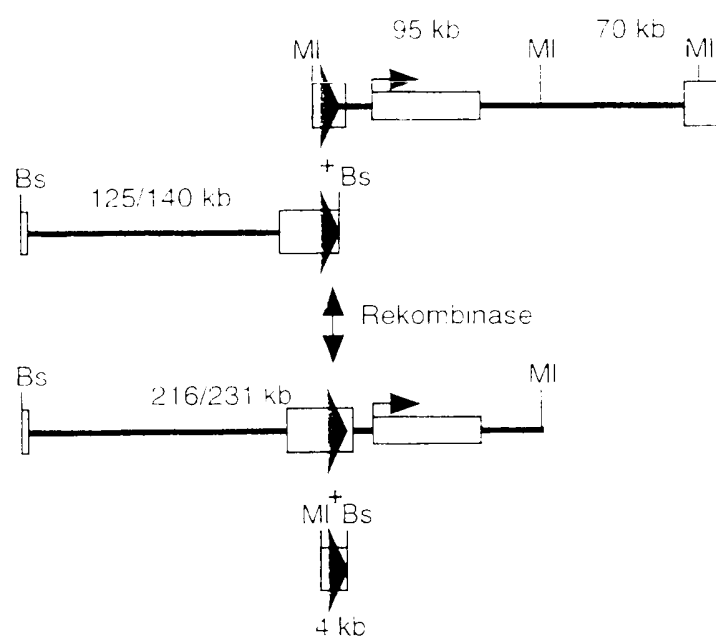


Fig. 3

4/18

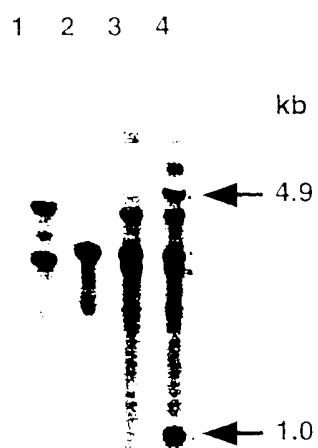
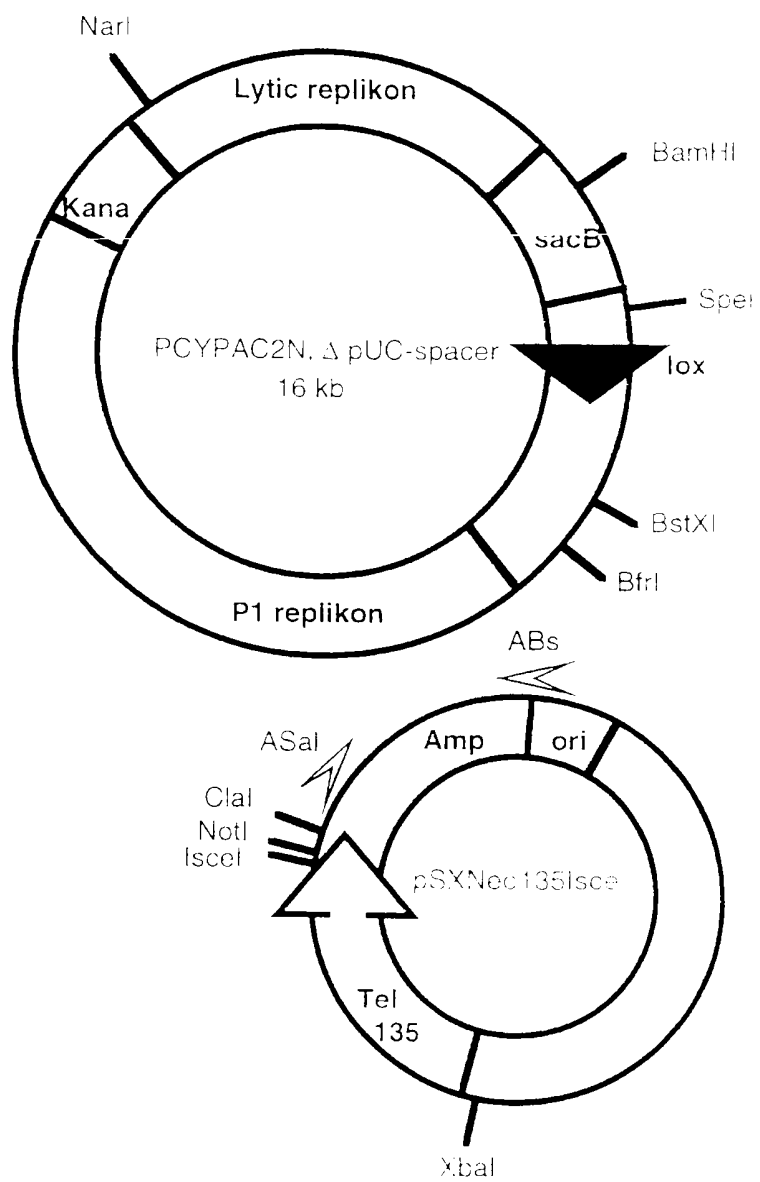


Fig. 4

5/18



6/18

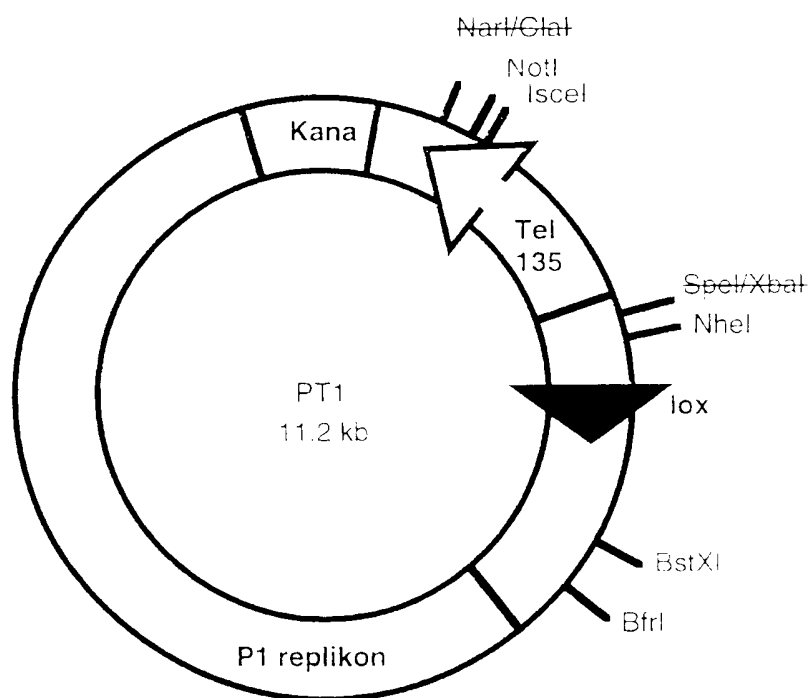


Fig. 6

7/18

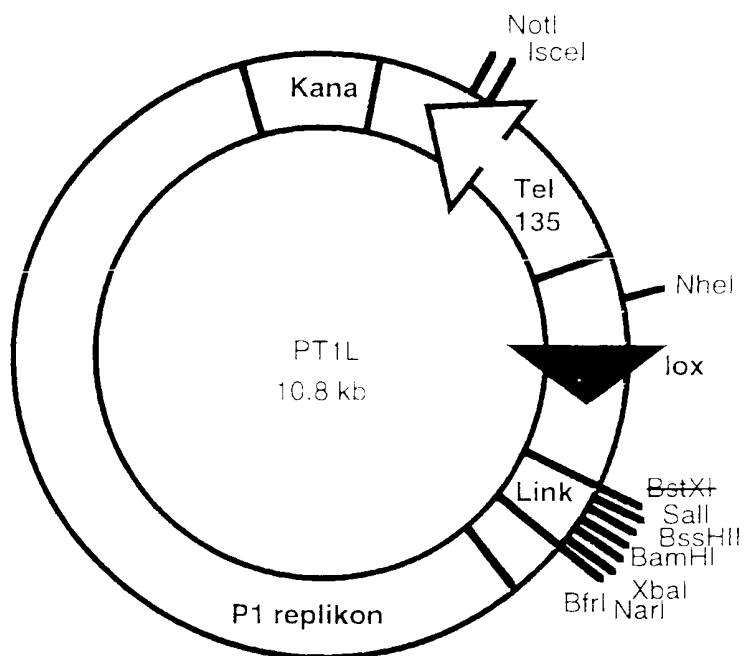
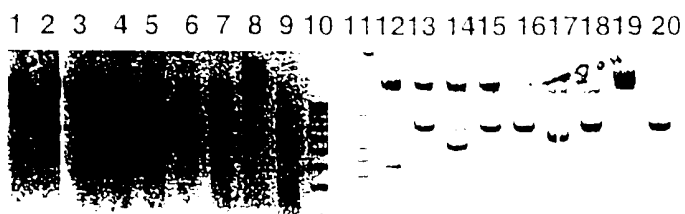
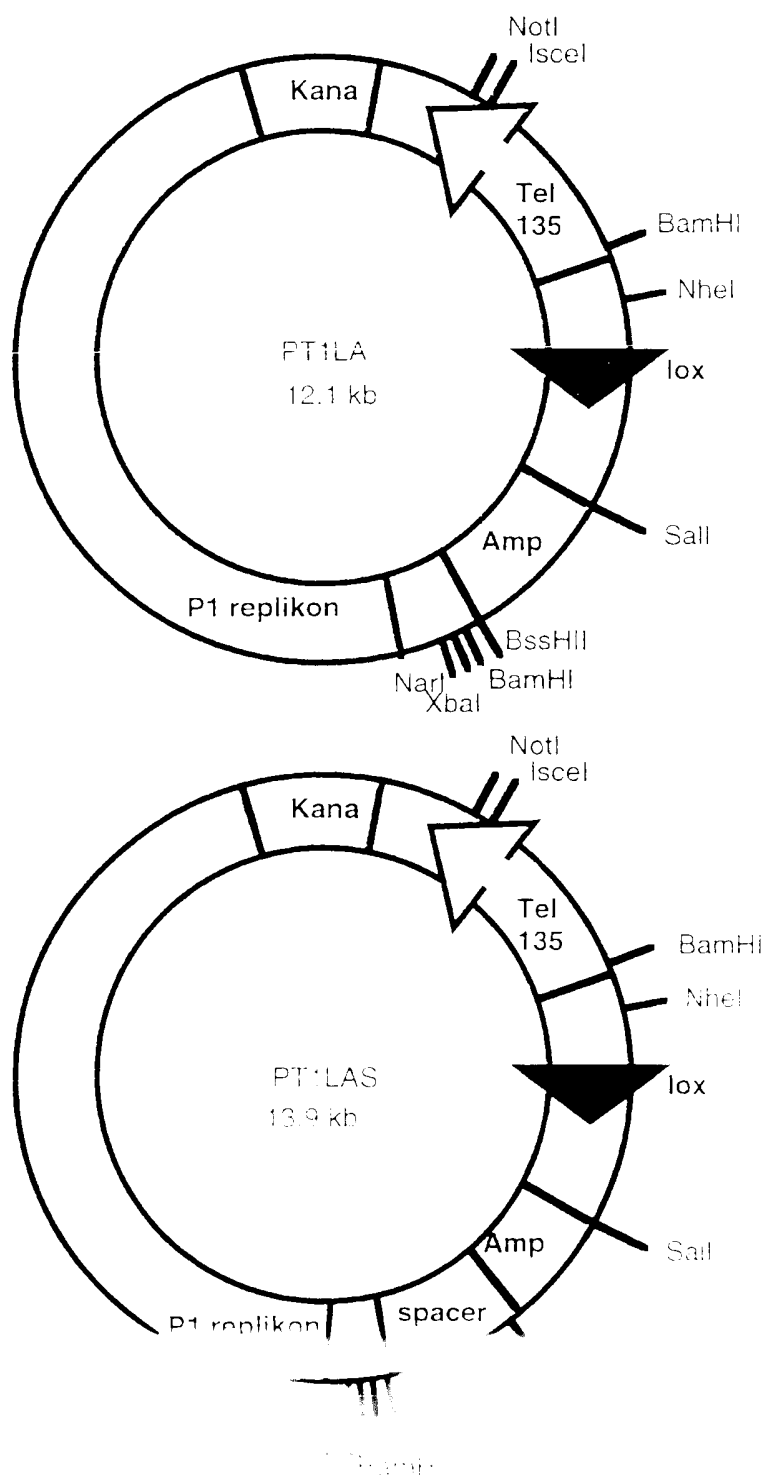


Fig. 7





8/18



9/18

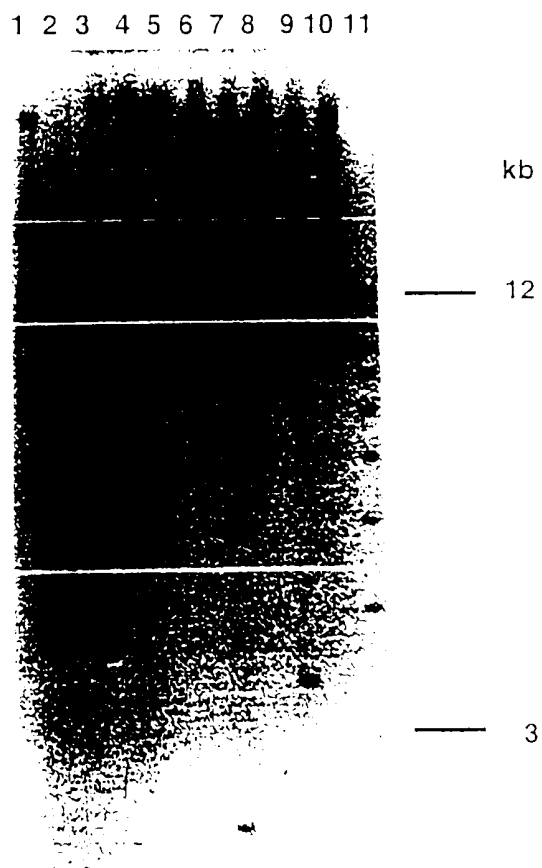


Fig. 10

10/18

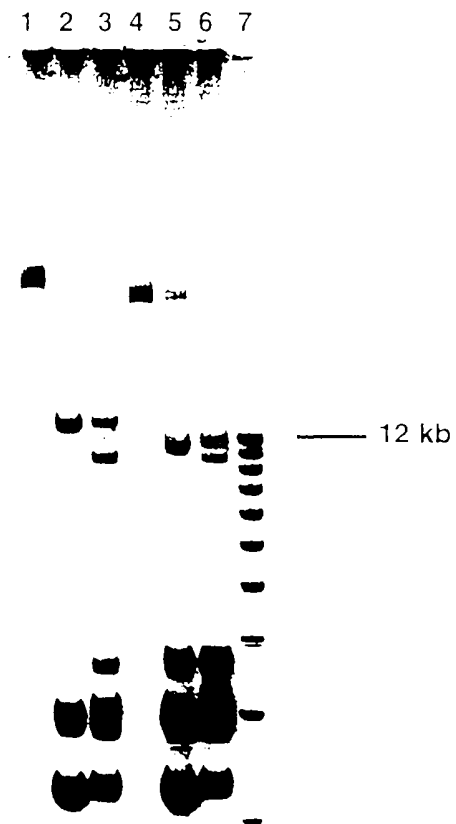


Fig. 11

11/18

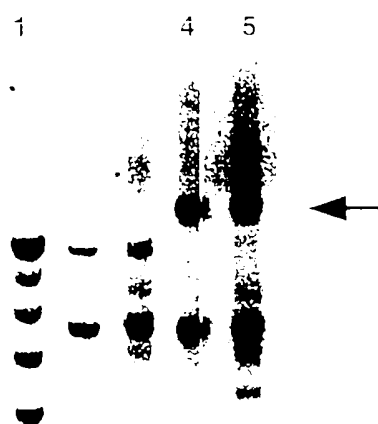


Fig. 12

12/18

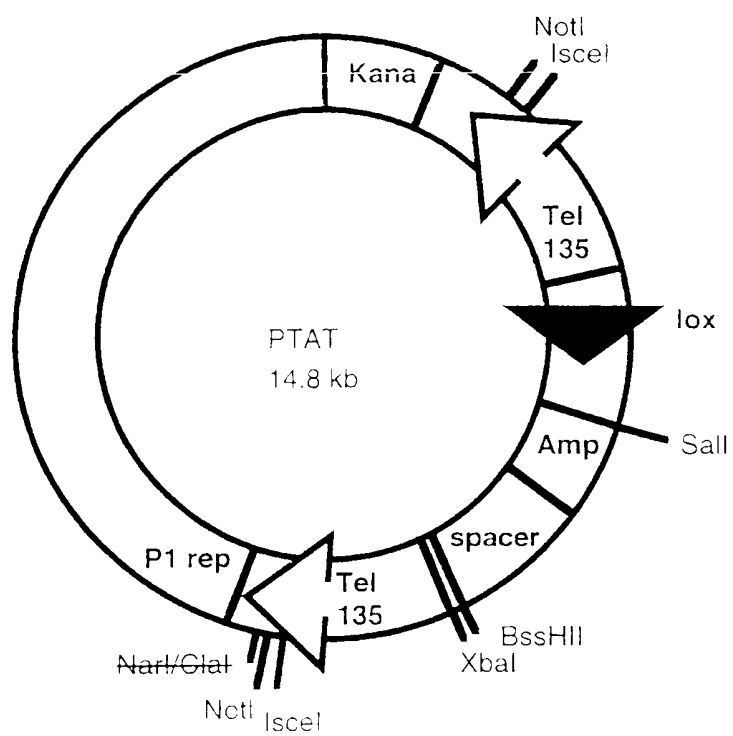


Fig. 13

13/18

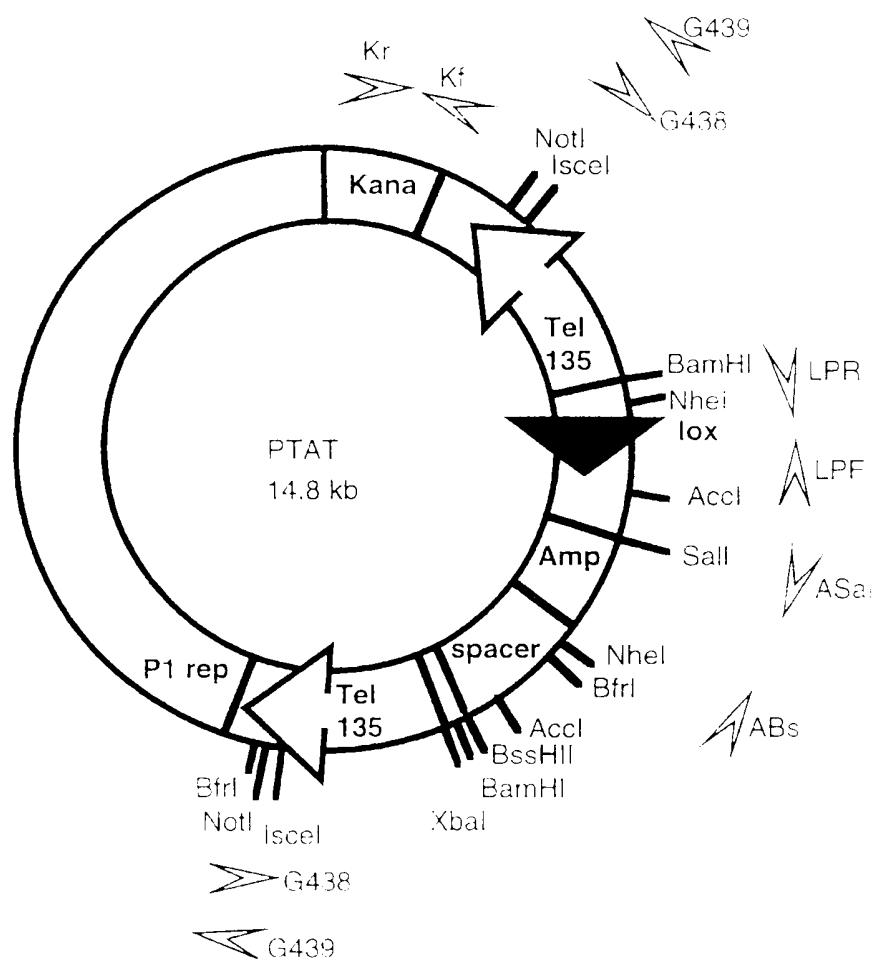


FIG. 11

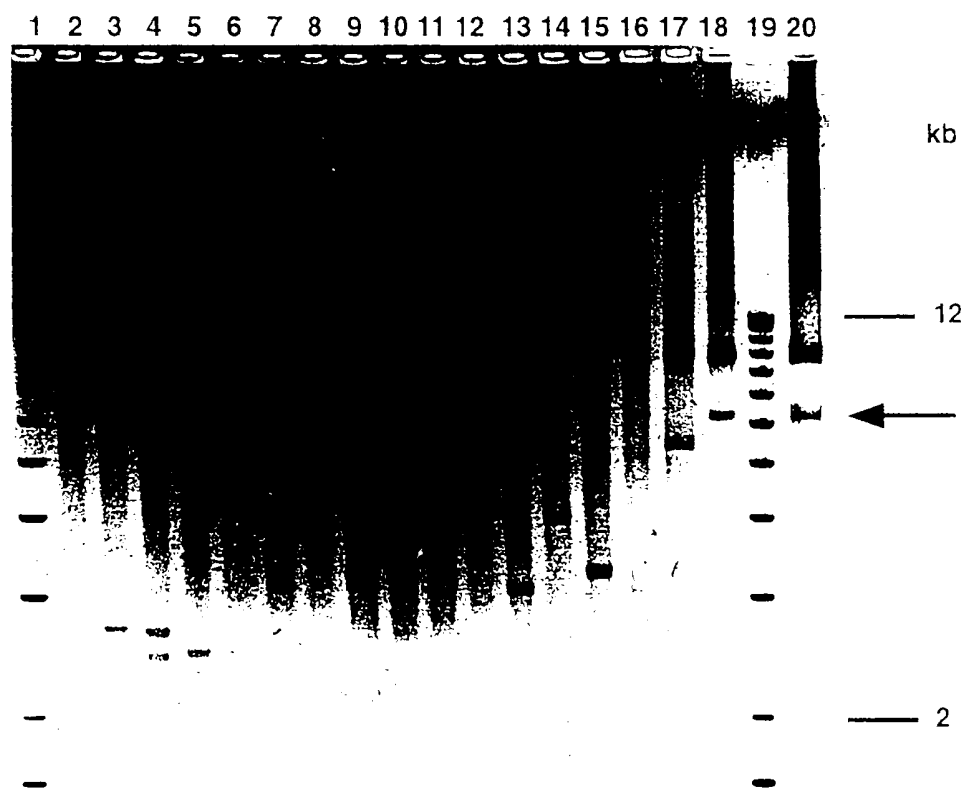


Fig. 15

G438: 5'-GGCCGCGCTAGGGATAACAGGGTAATATA-3'  
G439: 5'-GGCCTATATTACCCTGTTATCCCTAGCGC-3'

LPF: 5'-GAAACGGCCTTAACGACGTAAGTCG-3'  
LPR: 5'-ATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTG-3'

ASal: 5'-GCGAGTCGACAGGGCCTCGTGATACG-3'  
ABs: 5'-GATTGCGCGCAGAAAAAAGGATCTC-3'

Kf: 5'-GGAAAACAGCATTCCAGGTATTAG-3'  
Kr: 5'-CCATGAGTGACGACTGAATCCG-3'

PT21: 5'-TTAAGGCGCCAAATCTAGAGGATCCGCGCGCAAGAGGTGACCTAA-3'  
PT22: 5'-GTCGACCTCTTGCGCGCGGATCCTCTAGATTTGGCGCC-3'

Fig. 16



16/18

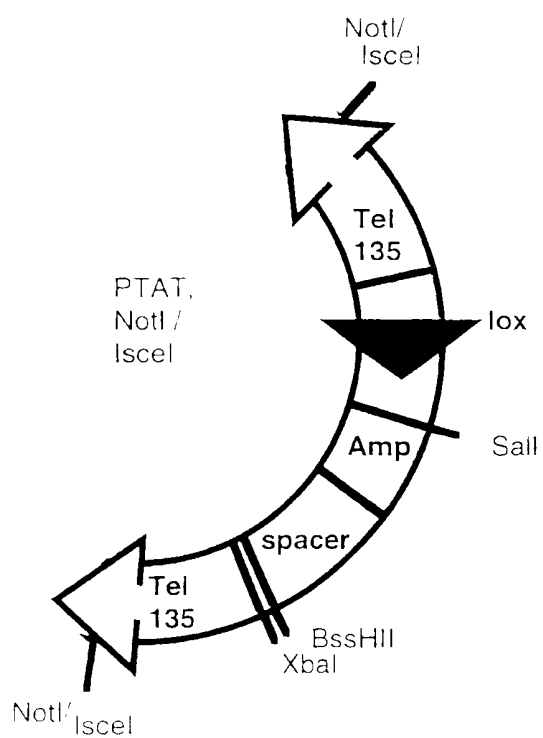
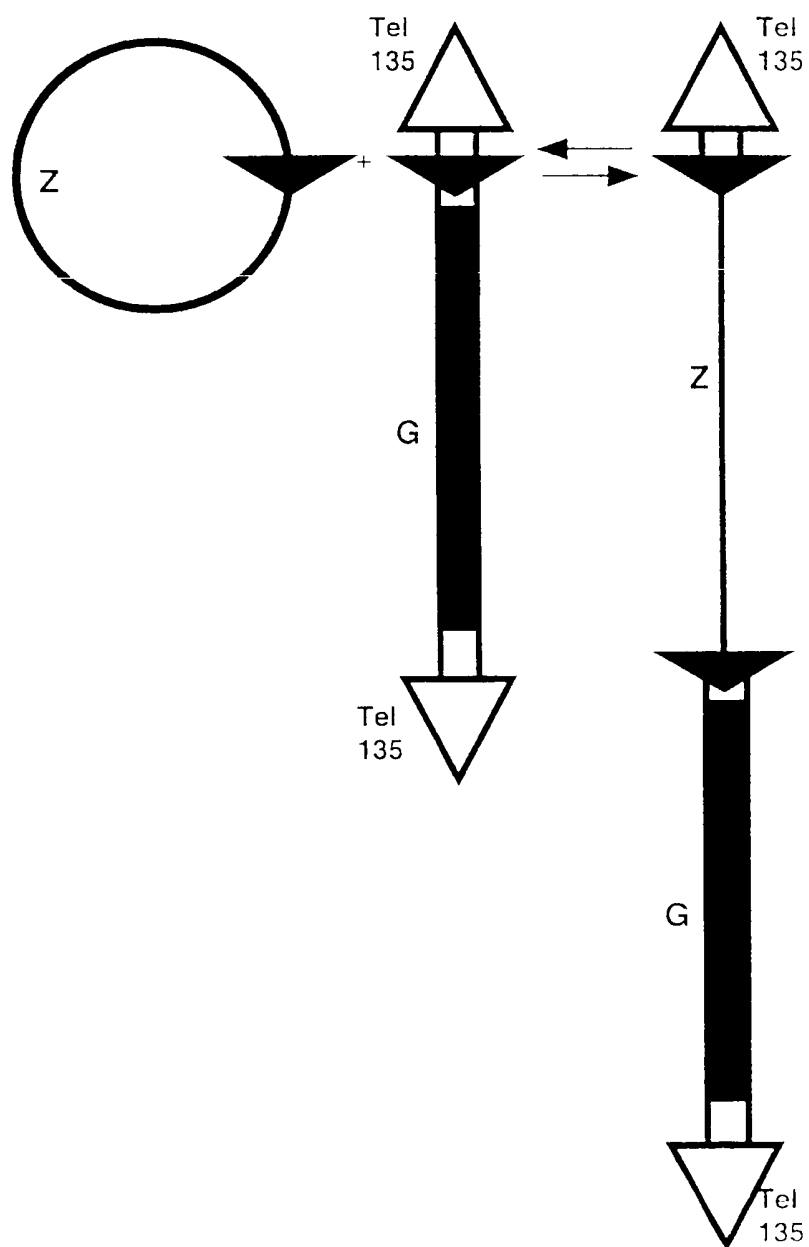


Fig. 17

17/18



18/19

